Brucella abortus Antibody Test Kit / Bovine Milk

Kit de détection des anticorps dirigés contre *Brucella abortus* dans les laits bovins

Kit para detecção de Anticorpos contra *Brucella abortus* no leite de bovinos

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Brucella abortus* en leche de bovino

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Brucella abortus* in Milch von Rindern

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.

IDEXX **Brucellosis Milk X2**

Test With Confidence™

IDEXX

06-40709-06

Brucella abortus Antibody Test Kit/Bovine Milk

For veterinary use only

Name and Intended Use

IDEXX Brucellosis Milk X2 ELISA Test Kit provides a rapid, simple, sensitive and specific method for detecting antibodies against *Brucella abortus* (*B. abortus*) in bovine individual and bulk milk samples.

In Member States of the European Union, ELISA tests done on milk must be conducted on bulk milk samples as required in Annex C of EU Decision 2008/984/EC.

Descriptions and Principles

Microtiter plates are supplied precoated with inactivated antigen. Dilutions of the samples to be tested are incubated in the wells of these plates. Any antibody specific for *B. abortus* binds to the antigen in the wells and forms an antigen/antibody complex on the plate well surface. Unbound material is removed from the wells by washing. A peroxidase-labeled anti-ruminant IgG Conjugate is added, which binds to the ruminant antibodies complexed with the *B. abortus* antigen. Unbound Conjugate is removed by washing and the TMB Substrate is added to the wells. The degree of color that develops (optical density measured at 450 nm) is directly proportional to the amount of antibody specific for *B. abortus* present in the sample. The diagnostic relevance of the result is obtained by comparing the optical density (OD) that develops in wells containing the samples with the OD from wells containing the Positive Control.

Reagents		**Volume**
1	*B. abortus* Antigen Coated Plate	10
2	Positive Control (lyophilized)	1 x 5.0 mL
3	Negative Control (lyophilized)	1 x 5.0 mL
4	Conjugate	1 x 110 mL
A	TMB Substrate N.12	1 x 100 mL
B	Stop Solution N.3	1 x 100 mL
C	Wash Concentrate (10X)	1 x 480 mL
Other components: Zip lock bag		1

Note: See table at the end of the insert for a description of international symbols used on the labels of this kit.

Storage

Store the reagents at 2–8°C. Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

Materials Required but Not Provided

- Precision micropipettes or multi-dispensing micropipettes
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well microplate reader (equipped with 450 nm filter)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test.
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- Humid Chamber/ Incubator capable of maintaining a temperature of +37°C (±3°C)
- Centrifuge (capacity 2000 x g)
- Microplate shaker

Precautions and Warnings for Users

- Handle all biological material as potentially infectious.
- The Substrate solution is irritating to eyes, respiratory system, and skin. Avoid contact with skin and eyes.
- Wear protective gloves/protective clothing/eye or face protection when handling samples and reagents
- Refer to the product Material Safety Data Sheet for additional information.

Laboratory Practices

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing, and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components. Do not pour unused reagents back into containers.
- Do not use kit past expiration date and do not intermix components from kits with different lot numbers.

Preparation of Reagents

Controls

Reconstitute Negative and Positive Controls with 5 ml of distilled/deionized water.
Notes: Reconstituted Controls must be aliquoted and kept frozen.

Wash Solution

Determine the amount of Wash Solution needed for washing the microtiter plates and diluting the samples and controls. Dilute the Wash Concentrate (10X) 1/10 with water (1 part Wash Concentrate with 9 parts water, e.g., 100 mL Wash Concentrate (10X) + 900 mL distilled water). When prepared under sterile conditions, the Wash Solution can be stored for one week at 2–8°C.

Preparation of Reagents

Milk samples must be skimmed milk samples (obtained after centrifugation).

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use. Reagents should be mixed by gentle swirling or vortexing.

1. Dilute the Positive Control 1/4 in a separate tube with the Wash Solution.
2. Dispense 50 μL of Wash Solution into each well of the microtiter plate.
3. Add 50 μL of the DILUTED Positive Control into two appropriate wells.
   Final dilution of positive control = 1/8
   Add 50 μL of UNDILUTED Negative Control into two appropriate wells.
   Add 50 μL of UNDILUTED skimmed milk samples into the appropriate wells.
   Final dilution of samples and Negative Control milk = 1/2
4. Mix the contents within each well by gently shaking the microtiter plate briefly (a microtiter plate shaker might be used).
5. Cover the plate and incubate for:
   - Individual milk and bulk milk up to 125 cows: 60 minutes (±5 min.) at +37°C (±3°C) or 14–18 hours at 2–8°C.
   - Bulk milk from 126 cows up to 250 cows: 14–18 hours at 2–8°C.

   With either options, plates should be hermetically sealed or covered and incubated in a humid chamber.
6. Empty or aspirate liquid content from the microwells and wash each well with approximately 300 μL of Wash Solution three times. Discard the liquid contents of all wells after each wash. Following the final fluid removal, firmly tap residual washfluid from each plate onto absorbent material. Avoid plate drying between washes and prior to the addition of the next reagent.
7. Dispense 100 μL of Conjugate into each well.
8. Cover the plate and incubate for 60 minutes (±5 min.) at +37°C (±3°C). The plate(s) should be hermetically sealed or covered and incubated in a humid chamber.
9. Repeat Step 6.
10. Dispense 100 μL TMB Substrate N.12 into each well.
11. Incubate at 18–26°C for 15 minutes (±1 min.).
12. Stop the color reaction by adding 100 μL of Stop Solution N.3 per well. The Stop Solution should be dispensed in the same order and at the same speed as the Substrate.
13. Read the results using a photometer at a wavelength of 450 nm.

Results

To validate the assay, the mean optical density (OD) of the Positive Control ($PC\bar{x}$) should not exceed 2.000 and the mean OD of the Negative Control ($NC\bar{x}$) should not exceed 0.500. The difference between the Positive and the Negative Control mean ODs ($PC\bar{x}$–$NC\bar{x}$) must be ≥ 0.300. Make sure to read the plates within two hours after the addition of the Stop Solution.

Note: IDEXX has instrument and software systems available that calculate means and % values and provide data summaries.

Calculation

The ODs of samples tested in duplicates must be averaged. The mean OD of the Positive Control (PC$\bar{x}$) and the OD of the sample (Sample A_{450}) are corrected by subtracting the mean OD of the Negative Control (NC$\bar{x}$):

Positive Control corrected OD:	Sample corrected OD:	S/P ratio for each sample:
PC$\bar{x}$ – NC$\bar{x}$	Sample A_{450} – NC$\bar{x}$	$S/P\ \% = 100 \times \frac{\text{Sample } A_{450} - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$

Interpretation of Results

Interpretation for individual milks and bulk milk samples up to 125 cows:

S/P % (short incubation)	< 30 %	≥ 30 %
S/P % (long incubation)	< 60 %	≥ 60 %
Interpretation	Negative	Positive

Interpretation for bulk milk samples from 126 up to 250 cows:

S/P % (long incubation)	< 30 %	≥ 30 %
Interpretation	Negative	Positive

If a pool yields a positive result, it is recommended that test samples used to prepare the pool should be analyzed individually.

👁 = *Major change in the user instructions*

Summarized Test Procedure:

IDEXX strongly recommends that you read the complete instructions carefully before using the test for the first time.

<table>
<tr><th>Step</th><th colspan="3">Action</th></tr>
<tr><td>1. Reagents</td><td colspan="3">Reconstitute the lyophilized Control milks each with 5 ml of sterile water.
Dilute the Wash Concentrate (10X) 1/10 with water to prepare the Wash Solution.</td></tr>
<tr><td>2. Sample Distribution</td><td colspan="3">Dilute the Positive Control 1/4 in a separate tube with the Wash Solution.
Dispense 50 μL of Wash Solution into each well of the microtiter plate.
Add 50 μL of the DILUTED Positive Control into two appropriate wells.
Final dilution of Positive Control = 1/8
Add 50 μL of UNDILUTED Negative Control into two appropriate wells.
Add 50 μL of UNDILUTED skimmed milk samples into the appropriate wells
Final dilution of samples and negative control milk = 1/2.
Mix the contents within each well by gently shaking the microtiter plate briefly (a microtiter plate shaker might be used).</td></tr>
<tr><td>3. Sample Incubation</td><td colspan="3">Cover the plate and incubate for:
• Individual milk and bulk milk up to 125 cows: 60 minutes (±5 min.) at +37°C (±3°C) or 14–18 hours at 2–8°C.
• Bulk milk from 126 cows up to 250 cows: 14–18 hours at 2–8°C in a humid chamber.
With either options, plates should be hermetically sealed or covered and incubated in a humid chamber.</td></tr>
<tr><td>4. Washing the Plate</td><td colspan="3">Empty or aspirate liquid content from the microwells and wash each well with approximately 300 μL of Wash Solution three times.</td></tr>
<tr><td>5. Conjugate distribution</td><td colspan="3">Dispense 100 μL of Conjugate into each well.</td></tr>
<tr><td>6. Conjugate incubation</td><td colspan="3">Cover the plate and incubate it for 60 minutes (±5 min.) at +37°C (±3°C). The plate(s) should be hermetically sealed or covered and incubated in a humid chamber.</td></tr>
<tr><td>7. Repeat step 4</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>8. Substrate distribution</td><td colspan="3">Dispense 100 μL TMB Substrate N.12 into each well.</td></tr>
<tr><td>9. Substrate incubation</td><td colspan="3">Incubate at 18–26°C for 15 minutes (±1 min.).</td></tr>
<tr><td>10. Stopping the reaction</td><td colspan="3">Stop the color reaction by adding 100 μL Stop Solution N.3 per well.</td></tr>
<tr><td>11. Measure the plate</td><td colspan="3">Read the results using a photometer at a wavelength of 450 nm.</td></tr>
<tr><td rowspan="9">12. Interpretation</td><td colspan="3">Interpretation for individual milk and bulk milk samples up to 125 cows:</td></tr>
<tr><td>S/P % (short incubation)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>S/P % (long incubation)</td><td>< 60 %</td><td>≥ 60 %</td></tr>
<tr><td>Interpretation</td><td>Negative</td><td>Positive</td></tr>
<tr><td colspan="3">Interpretation for bulk milk samples from 126 up to 250 cows:</td></tr>
<tr><td>S/P % (long incubation)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>Interpretation</td><td>Negative</td><td>Positive</td></tr>
<tr><td colspan="3">If a pool yields a positive result, it is recommended that test samples used to prepare the pool should be analyzed individually.</td></tr>
</table>

For technical assistance:

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: idexx.com/contactlpd
IDEXX Technical Support: +800 727 43399

Kit de détection des anticorps dirigés contre *Brucella abortus* dans les laits bovins

Réservé à l'usage vétérinaire

Nom et usage

IDEXX Brucellosis Milk X2 est un test immunoenzymatique (ELISA) pour la détection des anticorps dirigés contre *Brucella abortus* (*B. abortus*) à partir d'échantillons de laits individuels et de laits de tank bovins.

Dans les Etats Membres de l'Union Européenne, les tests ELISA effectués sur échantillons de lait doivent être réalisés à partir de laits de tank comme requis dans l'annexe C de la Décision Européenne 2008/984/EC.

Description et principe

Les cupules de la plaque de microtitration sont sensibilisées avec l'antigène inactivé de *B. abortus*.
Si l'échantillon contient des anticorps anti-*B. abortus*, ceux-ci se combinent avec l'antigène fixé dans les cupules pour former un complexe anticorps-antigène. Après lavage pour éliminer les fractions non-liées, le Conjugué IgG anti-ruminant marqué à la peroxidase de raifort est ajouté et se lie aux antigènes *B. abortus* capturés. Le Conjugué non-lié est éliminé par lavage et le Substrat TMB est ajouté dans les puits: l'intensité de la coloration qui se développe est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. L'évaluation diagnostique est réalisée par comparaison des densités optiques (DO) obtenues pour les échantillons et les Contrôles.

Réactif		Volume
1	Plaque sensibilisée avec des antigènes de *B. abortus*	10
2	Contrôle positif (lyophilisé)	1 x 5,0 ml
3	Contrôle négatif (lyophilisé)	1 x 5,0 ml
4	Conjugué	1 x 110 ml
A	Substrat TMB N°12	1 x 100 ml
B	Solution d'arrêt N°3	1 x 100 ml
C	Solution de lavage concentrée (10X)	1 x 480 ml
Autres composants: sachet plastique hermétique réutilisable		1

Remarque: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles internationaux utilisés sur les étiquettes de la trousse.

Conservation

Conserver les réactifs à 2–8°C. Les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption à condition d'être conservés correctement.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux
- Embouts de pipette à usage unique
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé d'un filtre à 450 nm)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs
- Couvercles pour microplaques, aluminium ou adhésifs
- Chambre humide / Incubateur de plaques à +37°C (±3°C)
- Centrifugeuse à 2000 x g
- Agitateur de microplaques

Mises en garde et précautions d'emploi

- Manipuler tous les réactifs et les échantillons comme une source potentielle de contamination.
- La solution de substrat est irritante pour les yeux, le système respiratoire et la peau.
  Eviter tout contact avec les yeux et la peau.
- Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux ou du visage lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
- Se reporter à la fiche de sécurité du produit pour plus d'informations.

Pratiques de laboratoire

- Des résultats optimaux seront obtenus en se conformant de manière stricte au protocole suivant. La précision du test dépend des éléments suivants: pipetage, minutage et lavage minutieux au cours de cette procedure.
- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à la lumière directe du soleil ou aux agents oxydants. Veiller à la propreté de la verrerie et/ou du matériel de laboratoire en matière plastique utilisés lors de sa manipulation.
- Tous les déchets doivent être correctement décontaminés avant leur élimination. Éliminer les contenus selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Éviter la contamination des composants du kit. Ne pas verser les réactifs non utilisés de nouveau dans les conteneurs.
- Ne pas utiliser les trousses après leur date de péremption et ne pas mélanger les composants avec ceux de trousses ayant un numéro de lot différent.

Préparation des réactifs

Contrôles

Reconstituer les Contrôles positif et négatif avec 5 ml d'eau distillée.
Note: Les Contrôles reconstitués doivent être aliquotés et conservés congelés.

Solution de lavage

Préparer le volume nécessaire de Solution de lavage à partir de la Solution de lavage concentrée (10X): diluer 1 volume de Solution de lavage concentrée (10X) avec 9 volumes d'eau distillée. Cette solution doit être fraîchement préparée avant chaque utilisation. Lorsque la Solution de lavage est préparée dans des conditions stériles (c. à d. utilisation de pipettes stériles, d'eau ultra pure et de récipients stériles, prélèvements des volumes utilisés dans des conditions stériles); elle peut être conservée pendant 7 jours à 2–8°C.

Préparation des échantillons

Echantillons de lait: les échantillons de lait doivent être écrémés (après centrifugation).

Mode opératoire

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien les homogénéiser par agitation douce ou au vortex.

1. Diluer le Contrôle positif au 1/4 avec la Solution de lavage dans un tube à essais.
2. Distribuer 50 μl de Solution de lavage dans chaque cupule.
3. Distribuer 50 μl de Contrôle positif DILUE dans deux cupules appropriées.
   Dilution finale du contrôle positif = 1/8
   Distribuer 50 μl de Contrôle négatif NON DILUE dans deux cupules appropriées.
   Distribuer 50 μl d'échantillons de lait écrémé NON DILUE dans les cupules adjacentes de la microplaque.
   Dilution finale du Contrôle négatif et des échantillons = 1/2
4. Agiter brièvement la microplaque pour homogénéiser les échantillons (l'utilisation d'un agitateur de microplaque est recommandée).
5. Couvrir la microplaque et incuber:
   - Échantillons individuels de laits et laits de tank jusqu'à 125 vaches: 60 minutes (±5 min.) à +37°C (±3°C) ou 14–18 heures à 2–8°C.
   - Mélanges de laits de tank de 126 vaches jusqu'à 250 vaches: 14–18 heures à 2–8°C.

   Quelle que soit l'option choisie, les plaques doivent être séllées hermétiquement ou couvertes et incubées en chambre humide pour éviter toute évaporation.
6. Vider ou aspirer les puits de la microplaque et laver 3 fois chaque puits avec environ 300 μl de Solution de lavage. Eliminer la Solution de lavage contenue dans la plaque entre chaque lavage. Après la dernière élimination consécutive au dernier lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la plaque sur du papier absorbant. Eviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du prochain réactif.
7. Distribuer 100 μl de Conjugué dans chaque cupule.
8. Couvrir la microplaque et incuber pendant 60 minutes (±5 min.) à +37°C (±3°C).
   Les plaques doivent être séllées hermétiquement ou couvertes et incubées en chambre humide pour éviter toute évaporation.
9. Répéter l'étape 6.
10. Distribuer 100 μl de Substrat TMB N°12 dans chaque cupule.
11. Incuber à 18–26°C durant 15 minutes (±1 min.).
12. Ajouter 100 μl de Solution d'arrêt N°3 dans chaque cupule. La distribution de la Solution d'arrêt devrait se faire dans le même ordre et à la même vitesse que la distribution du Substrat. L'ajout de la Solution d'arrêt dans les cupules conduit à un changement de couleur du Substrat de bleu à jaune.
13. Les résultats des réactions colorimétriques sont lus sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm.

Résultats

Pour la validation de la manipulation, la densité optique (DO) moyenne du Contrôle négatif (CN$\overline{x}$) ne doit pas dépasser 0,500. La DO moyenne du Contrôle positif (CP$\overline{x}$) ne doit pas dépasser 2,000. La différence entre la moyenne de DO du Contrôle positif et celle du Contrôle négatif (CP$\overline{x}$–CN$\overline{x}$) doit être ≥ 0,300. La mesure de la densité optique doit impérativement être effectuée dans les 2 heures après arrêt de la réaction.

Note: IDEXX est en mesure de fournir matériel et logiciel informatique pour le calcul des résultats et l'enregistrement des données.

Calculs

Calculer la moyenne des valeurs de densité optique des échantillons testés en double. Les valeurs de densité optique des échantillons (Echantillon A450) et du Contrôle Positif (CP$\overline{x}$) sont corrigées par soustraction de la valeur de densité optique moyenne du Contrôle Négatif (CN$\overline{x}$):

DO corrigée du Contrôle positif:	DO corrigée de l'Échantillon:	Calcul du pourcentage E/P (%) pour chaque échantillon:
CP$\overline{x}$ – CN$\overline{x}$	Échantillon A450 – CN$\overline{x}$	$\text{E/P \%} = 100 \times \frac{\text{Échantillon A450} - \text{CN}\overline{x}}{\text{CP}\overline{x} - \text{CN}\overline{x}}$

Interprétation

Interprétation pour échantillons individuels de laits et pools de laits jusqu'à 125 vaches:

E/P % (incubation courte)	< 30 %	≥ 30 %
E/P % (incubation longue)	< 60 %	≥ 60 %
Interprétation	Négatif	Positif

Interprétation pour les mélanges de laits de 126 vaches jusqu'à 250 vaches:

E/P % (incubation longue)	< 30 %	≥ 30 %
Interprétation	Négatif	Positif

Pour les mélanges trouvés positifs, il est recommandé que chaque échantillon à l'origine du mélange soit analysé de façon individuelle.

👁 = *Modification majeure du mode d'emploi*

Résumé du Mode opératoire

Avant la première mise en oeuvre du test, il est vivement recommandé de lire l’ensemble du mode d’emploi.

<table>
<tr><th>Etape</th><th colspan="3">Action</th></tr>
<tr><td>1. Préparation des réactifs</td><td colspan="3">Reconstituer les Contrôles positif et négatif avec 5 ml d’eau distillée.
Diluer 1 volume de Solution de lavage concentrée (10X) avec 9 volumes d’eau distillée.</td></tr>
<tr><td>2. Dilution des échantillons et des contrôles</td><td colspan="3">Diluer le Contrôle positif au 1/4 dans un tube à essais avec la Solution de lavage.
Distribuer 50 μl de Solution de lavage dans chaque cupule.
Distribuer 50 μl de Contrôle positif DILUE dans deux cupules appropriées de la microplaque.
Dilution finale du Contrôle positif = 1/8
Distribuer 50 μl de Contrôle négatif NON DILUE dans deux cupules appropriées.
Distribuer 50 μl d’échantillons de lait écrémé NON DILUE dans les cupules adjacentes.
Dilution finale du Contrôle négatif et des échantillons = 1/2
Agiter brièvement la microplaque pour homogénéiser les échantillons (l’utilisation d’un agitateur de microplaque est recommandée).</td></tr>
<tr><td>3. Incubation des échantillons</td><td colspan="3">Couvrir la microplaque et incuber:
• Échantillons individuels de laits et mélanges de laits jusqu’à 125 vaches: 60 minutes (±5 min.) à +37°C (±3°C) ou 14–18 heures à 2–8°C.
• Mélanges de laits de 126 vaches jusqu’à 250 vaches: 14–18 heures à 2–8°C.
Quelle que soit l’option choisie, les plaques doivent être séllées hermétiquement ou couvertes et incubées en chambre humide pour éviter toute évaporation.</td></tr>
<tr><td>4. Lavage des plaques</td><td colspan="3">Vider ou aspirer les puits de la microplaque et laver 3 fois chaque puits avec environ 300 μl de Solution de lavage.</td></tr>
<tr><td>5. Distribution du Conjugué</td><td colspan="3">Distribuer 100 μl de Conjugué dans chaque cupule.</td></tr>
<tr><td>6. Incubation du Conjugué</td><td colspan="3">Couvrir la microplaque et incuber pendant 60 minutes (± 5 min.) à +37°C (±3°C). Les plaques doivent être séllées hermétiquement ou couvertes et incubées en chambre humide pour éviter toute évaporation.</td></tr>
<tr><td>7. Répéter l’étape 4</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>8. Distribution du Substrat</td><td colspan="3">Distribuer 100 μl de Substrat TMB N°12 dans chaque cupule.</td></tr>
<tr><td>9. Incubation du Substrat</td><td colspan="3">Incuber à 18–26°C durant 15 minutes (±1 min.).</td></tr>
<tr><td>10. Arrêt de la réaction</td><td colspan="3">Ajouter 100 μl de Solution d'arrêt N°3 dans chaque cupule.</td></tr>
<tr><td>11. Lecture de la plaque</td><td colspan="3">Les résultats des réactions colorimétriques sont lus sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm.</td></tr>
<tr><td rowspan="8">12. Interprétation</td><td colspan="3">Interprétation pour échantillons de laits individuels et de laits de tank jusqu’à 125 vaches:</td></tr>
<tr><td>E/P % (incubation courte)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>E/P % (incubation longue)</td><td>< 60 %</td><td>≥ 60 %</td></tr>
<tr><td>Interprétation</td><td>Négatif</td><td>Positif</td></tr>
<tr><td colspan="3">Interprétation pour les mélanges de laits de 126 vaches jusqu'à 250 vaches:</td></tr>
<tr><td>E/P % (incubation longue)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>Interprétation</td><td>Négatif</td><td>Positif</td></tr>
<tr><td colspan="3">Pour les mélanges trouvés positifs, il est recommandé que chaque échantillon à l'origine du mélange soit analysé de façon individuelle.</td></tr>
</table>

Pour toute information:

Contactez votre représentant local IDEXX ou visitez: idexx.com/contactlpd
IDEXX Technical Support: +800 727 43399

*IDEXX et Test With Confidence sont des marques de commerce ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

Kit para detecção de Anticorpos contra *Brucella abortus* no leite de bovinos

Para uso exclusivamente veterinário

Nome e Indicações

IDEXX Brucellosis Milk X2 oferece um método rápido, simples, sensível e específico para detecção de anticorpos contra *Brucella abortus* (*B. abortus*) no leite bovino individual ou em pool.

Para os Estados Membros Europeus, os testes ELISA feitos em leite devem ser conduzidos em amostras de tanque de leite conforme AnexoC da EU Decision 2008/984/EC.

Informações gerais

São fornecidas placas de microtitulação impregnadas com antígeno inativado. As diluições das amostras que serão testadas são incubadas nas cavidades destas placas. Qualquer anticorpo específico contra o *B. abortus* liga-se ao antígeno nas cavidades e forma um complexo antígeno/anticorpo na superfície da cavidade da placa. O material não-ligado é removido das cavidades através de lavagem. É adicionado o conjugado anti-IgG ruminante marcado com peroxidase, que se liga aos anticorpos dos ruminantes no complexo com o antígeno contra a *B. abortus*. O conjugado não ligado é removido através de lavagem e o substrato que contém o TMB é adicionado às cavidades. A graduação da cor desenvolvida (densidade óptica medida a 450 nm) é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo específico contra *B. abortus* existente na amostra. O resultado é obtido comparando-se a densidade óptica (DO) que se desenvolve nas cavidades que contêm as amostras com a densidade óptica (DO) das cavidades que contêm o controle positivo.

Reagentes		**Volume**
1	Placa Impregnada com Antígeno *B. abortus*	10
2	Controle Positivo	1 x 5,0 ml
3	Controle Negativo	1 x 5,0 ml
4	Conjugado	1 x 110 ml
A	Substrato TMB No. 12	1 x 100 ml
B	Solução de Interrupção No. 3	1 x 100 ml
C	Concentrado de Lavagem (10X)	1 x 480 ml
Outros componentes: embalagem zip lock.		1

Nota: veja a tabela no final do protocolo para descrição dos símbolos internacionais usados nos rótulos dos kits.

Armazenagem

Conservar os reagentes a 2–8°C. Os reagentes são estáveis até a data de validade, desde que sejam devidamente conservados.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Micropipetas de precisão e micropipetas multicanal
- Ponteiras de pipeta descartáveis
- Proveta graduada para a solução de lavagem
- Leitor de placas para 96 cavidades (equipado com filtro 450 nm)
- Lavador de microplaca (sistema manual, semi-automático ou automático)
- Use somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste
- Câmara Úmida / Incubadora capaz de manter uma temperatura de +37°C (±3°C)
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio ou adesivo)
- Agitador de placas
- Centrífuga (capacidade de 2000 x g)

Precauções e Advertências

- Manipule todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- A solução Substrato causa irritação aos olhos, ao sistema respiratório e à pele. Evite contato com a pele e os olhos.
- Usar luvas de protecção/vestuário/olhos ou o rosto de protecção ao manusear amostras e reagentes.
- Consulte o Ficha de Segurança produto para informações adicionais.

Práticas laboratoriais

- Resultados ótimos serão obtidos seguindo-se rigorosamente o protocolo deste teste. Pipetagem cuidadosa, observação dos tempos de incubação e lavagens corretas durante todo o procedimento são necessários para manter a precisão e acurácia.
- Não exponha a solução de TMB à luz forte ou a agentes oxidantes. Manuseie a solução de TMB em recipientes limpos de vidro ou plástico.
- Todos os resíduos devem ser descontaminados adequadamente antes do descarte. Descarte os conteúdos de acordo com as normas locais, regionais e nacionais.
- Tenha cuidado para evitar a contaminação dos componentes do kit. Não devolver a sobra do reagente ao frasco.
- Não utilize kits com prazo de validade vencido e não misture componentes de kits de lotes diferentes.

Preparação dos reagentes

Controles

Reconstituir os controles positivos e negativos com 5 ml de água destilada.
Nota: Os controles devem ser reconstituído, aliquotado e armazenado congelado.

Solução de Lavagem

Determinar a quantidade necessária de Solução de Lavagem para fazer a lavagem das placas de microtitulação e para diluir amostras e controles. Diluir o Concentrado de Lavagem (10X) a 1/10 com água (1 parte de Concentrado de Lavagem (10X) para 9 partes de água; p. ex. 100 ml de Concentrado de Lavagem (10X) + 900 ml de água destilada). Quando a Solução de Lavagem é preparada em condições estéreis, pode ser armazenada durante uma semana a 2–8°C.

Precauções e Advertências

Amostras de leite deve ser desnatado (após a centrifugação).

Protocolo de teste

Todos os reagentes devem equilibrar-se com a 18–26°C antes do uso. Os reagentes devem ser homogeneizados por movimentos gentis por vórtex.

1. Diluir Controle Positivo em uma proporção de 1/4 em um tubo usando Solução de Lavagem
2. Distribuir 50 μl de Solução de Lavagem em cada uma das cavidades da placa de microtitulação.
3. Adicionar 50 μl de Controle Positivo DILUÍDO nas duas cavidades apropriadas da placa de microtitulação.
   Diluição final do Controle Positivo: 1/8
   Adicionar 50 μl de Controle Positivo NÃO-DILUÍDO nas duas cavidades apropriadas da placa de microtitulação.
   Adicionar 50 μl de amostras de leite desnatado NÃO-DILUÍDAS nas cavidades apropriadas da placa de microtitulação.
   Diluição final do Controle Negativo e amostras: 1/2
4. Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
5. Cobrir a placa e incubar:
   - Leite individual e leite em pool de até 125 vacas: 60 minutos (±5 min.) a 37°C (±3°C) ou 14–18 horas a 2–8°C.
   - Leite em pool de leite de 126 até 250 vacas: 14–18 horas a 2–8°C.

   Em ambas opções, a placa(s) deve ser hermeticamente selada ou ser coberta e incubada em uma câmara úmida.
6. Esvaciar ou aspirar o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar cada cavidade com aproximadamente 300 μl de Solução de Lavagem por 3 vezes. Remover o conteúdo líquido de todas as cavidades após cada lavagem. Após a remoção da solução de lavagem final, eliminar o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente. Evitar que a placa seque entre os lavados e antes de adicionar o próximo reagente.
7. Distribuir 100 μl do Conjugado em cada uma das cavidades.
8. Cobrir e incubar a placa por 60 minutos (±5 min.) a 37°C (±3°C). A placa(s) deve ser hermeticamente selada ou ser coberta e incubada em uma câmara úmida.
9. Repetir a etapa 6.
10. Distribuir 100 μl de Substrato TMB No.12 do em cada cavidade.
11. Incubar à 18–26°C durante 15 minutos (±1 min.).
12. Bloquear a reação cromática adicionando 100 μl de Solução de Interrupção No.3 por cavidade.
    A Solução de Interrupção No.3 deverá ser colocada na mesma ordem e na mesma velocidade utilizadas com o Substrato TMB No.12.
13. Ler os resultados usando um fotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

Resultados

Para validar o ensaio, a densidade óptica (DO) do Controle Positivo ($CP\bar{x}$) não deve exceder 2,000, e a DO do Controle Negativo ($CN\bar{x}$) 0,500, respectivamente. A diferença entre o Controle Positivo e o Negativo ($CP\bar{x} - CN\bar{x}$) deverá ser de ≥ 0,300. É imprescindível que a leitura das placas seja feita dentro de 2 horas após a adição da Solução de Interrupção.

Nota: IDEXX Laboratories, Inc. têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo de razões das médias e razões A/P e elaboração de resumo de dados.

Cálculos

Se o teste das amostras for realizado em duplicata, deverá ser obtida a média da DO. A densidade óptica média do Controle Positivo ($CP\bar{x}$), assim como a DO das amostras (Amostra A_{450}), são corrigidas subtraindo a DO média do Controle Negativo ($CN\bar{x}$):

DO corrigida do Controle Positivo:	**DO corrigida de Amostra:**	**Razão A/P de Amostra:**
$CP\bar{x} - CN\bar{x}$	Amostra $A_{450} - CN\bar{x}$	$A/P\ \% = 100 \times \frac{\text{Amostra } A_{450} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$

Interpretação de Resultados

Interpretação para leite individual e pool de até 125 vacas:

A/P % (incubação curta)	< 30 %	≥ 30 %
A/P % (incubação durante a noite)	< 60 %	≥ 60 %
Interpretação	Negativo	Positivo

Interpretação para pool de leite de 126 até 250 vacas:

A/P % (incubação durante a noite)	< 30 %	≥ 30 %
Interpretação	Negativo	Positivo

Se um pool de amostras è positivo, recomenda-se testar individualmente as amostras utilizadas para preparar o pool.

= Modificações importante nas instruções de uso

Resumo do procedimento de teste

É altamente recomendável que todas as instruções sejam lidas cuidadosamente antes de usar o produto.

Etapa	Ação
1. **Preparação dos reagentes**	Reconstituir os controles positivos e negativos com 5 ml de água destilada Diluir a Solução de Lavagem Concentrada (10X) do a 1/10 em água para preparar a Solução de Lavagem.
2. **Diluição da amostras**	Diluir controle positivo em uma proporção de 1/4 em um tubo usando Solução de Lavagem. Distribuir 50 µl de Solução de Lavagem em cada uma das cavidades da placa de microtitulação. Adicionar 50 µl de Controle Positivo DILUÍDO nas duas cavidades apropriadas da placa de microtitulação. Diluição final do Controle Positivo: 1/8 Adicionar 50 µl de Controle Positivo NÃO-DILUÍDO nas duas cavidades apropriadas da placa de microtitulação. Adicionar 50 µl de amostras de leite desnatado NÃO-DILUÍDAS nas cavidades apropriadas da placa de microtitulação. Diluição final do Controle Negativo e amostras: 1/2 Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
3. **Incubação da amostras**	Cobrir a placa e incubar: • Leite individual e leite em pool de até 125 vacas: 60 minutos (±5 min.) a 37°C (±3°C) ou 14–18 horas a 2–8°C. • Leite em pool de leite de 126 até 250 vacas: 14–18 horas a 2–8°C. Em ambas opções, a placa(s) deve ser hermeticamente selada ou ser coberta e incubada em uma câmara úmida.
4. **Lavagem da placa**	Esvaciar ou aspirar o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar cada cavidade com aproximadamente 300 µl de Solução de Lavagem por 3 vezes.
5. **Distribuição do Conjugado**	Distribuir 100 µl do Conjugado em cada uma das cavidades
6. **Incubação do Conjugado**	Cobrir e incubar a placa por 60 minutos (±5 min.) a 37°C (±3°C). A placa(s) deve ser hermeticamente selada ou ser coberta e incubada em uma câmara úmida.
7. **Repetir a etapa 4**	
8. **Distribuição do Substrato**	Distribuir 100 µl de Substrato TMB No.12 do em cada cavidade.
9. **Incubação do Substrato**	Incubar à 18–26°C durante 15 minutos (±1 min.).
10. **Interrupção da reação**	Bloquear a reação cromática adicionando 100 µl de Solução de Interrupção No.3 por cavidade.
11. **Leitura da placa**	Ler os resultados usando um fotômetro com comprimento de onda de 450 nm.
12. **Interpretação**	Interpretação para leite individual e pool de até 125 vacas: A/P % (incubação curta): < 30 % / ≥ 30 % A/P % (incubação durante a noite): < 60 % / ≥ 60 % Interpretação: Negativo / Positivo Interpretação para pool de leite de 126 até 250 vacas: A/P % (incubação durante a noite): < 30 % / ≥ 30 % Interpretação: Negativo / Positivo Se um pool de amostras è positivo, recomenda-se testar individualmente as amostras utilizadas para preparar o pool.

Assistência técnica:

Entre em contato com seu gerente de área ou distribuidor IDEXX. Ou visite: idexx.com/contactlpd
Assistência Técnica IDEXX Europe: +800 727 43399

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Brucella abortus* en leche de bovino

Para uso veterinario exclusivo

Nombre y uso previsto

IDEXX Brucellosis Milk X2 proporciona un método rápido, simple, sensible y específico para detectar anticuerpos frente a *Brucella abortus* (*B. abortus*) en muestras individuales o mezclas de leche de bovino.

En los países miembros de la Unión Europea, las pruebas ELISA realizadas en leche deben de realizarse en tanques de leche tal y como se requiere en el Anexo C de la Decisión de la Unión Europea 2008/984/EC.

Descripción y principios

Las placas de microtitulación se suministran tapizadas con un antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras se incuban en los pocillos de dichas placas. Cualquier anticuerpo específico frente a *B. abortus* se une al antígeno que tapiza los pocillos y forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo.
El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación se añade un conjugado formado por una IgG anti-rumiante unida al enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos que formaron el complejo con el antígeno de *B. abortus*. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y un substrato TMB es añadido a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450 nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *B. abortus* presente en la muestra. El resultado se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra, con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo.

Reactivos		**Volumen**
1	Placa tapizada con Antígeno de *B.abortus*	10
2	Control Positivo (liofilizado)	1 x 5,0 ml
3	Control Negativo (liofilizado)	1 x 5,0 ml
4	Conjugado	1 x 110 ml
A	Substrato TMB n.°12	1 x 100 ml
B	Solución de Frenado n.°3	1 x 100 ml
C	Solución de Lavado Concentrada (10X)	1 x 480 ml
Otros componentes: Bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable		1

Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos internacionales utilizados en las etiquetas del kit.

Almacenamiento

Almacenar los reactivos a 2–8°C. Los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando hayan sido almacenados en las condiciones correctas.

Materiales necesarios que no se suministran

- Micropipetas de precisión y micropipetas multidispensadoras
- Puntas de pipeta desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450-nm)
- Lavador de microplacas, manual, semiautomática o automática
- Usar sólo agua destilada o desionizada para preparar los reactivos de la prueba
- Cubiertas de placas (tapa, papel de aluminio o adhesivo, etc)
- Centrífuga (2000 x g)
- Agitador de placas
- Cámara húmeda/Incubadora capaz de mantener una temperatura de +37°C (± 3°C)

Precauciones y advertencias para los usuarios

- Considerar todo material biológico como potencialmente infeccioso cuando lo manipule
- La solución substrato irrita los ojos, el aparato respiratorio y la piel. Evitar el contacto con la piel y los ojos
- Usar guantes de protección / prendas de protección / gafas o protección de la cara al manipular muestras y reactivos.
- Consultar la Ficha de Datos de Seguridad de Materiales del producto para obtener información adicional.

Prácticas de laboratorio

- Los resultados óptimos se obtendrán siguiendo estrictamente este protocolo. El pipeteo cuidadoso, la coordinación y el lavado durante todo este procedimiento son necesarios para mantener la precisión y exactitud.
- No exponer las soluciones TMB a la luz fuerte o a cualquier agente oxidante. Manejar el Substrato TMB con material de cristal limpio o material plástico.
- Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de ser eliminados.
- Desechar el contenido de conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Extremar la precaución para evitar la contaminación de los componentes del kit.
  No verter los reactivos no utilizados de nuevo en contenedores.
- No utilizar los kits pasada su fecha de caducidad y no mezclar componentes de kits con número de lote distintos.

Preparación de los reactivos

Controles

Reconstituir los Controles Positivo y Negativo con 5 ml de agua destilada.
Notas: Los controles reconstituidos deben conservarse en partes alícuotas y congelados.

Solución de Lavado

La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe dejarse que adquiera 18–26°C y agitarse para asegurar la disolución de posibles sales precipitadas. Esta solución deberá diluirse 1/10 con agua destilada/desionizada antes de emplearla (por ej., 30 ml Solución de Lavado Concentrada (10X) más 270 ml de agua por placa a analizar). Preparándose en condiciones estériles, la Solución de Lavado puede almacenarse durante una semana a 2–8°C.

Preparación de las muestras

Las muestras de leche deben ser desnatadas (obtenidas después de centrifugar).

Protocolo del ensayo

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran 18–26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos en un vórtex suavemente.

1. Diluir en un tubo el Control Positivo a una relación 1/4 utilizando la Solución de Lavado.
2. Dispensar 50 μl de Solución de Lavado en cada pocillo de la placa de microtitulación.
3. Dispensar 50 μl de Control Positivo DILUIDO en dos pocillos correspondientes. Dilución final del Control Positivo = 1/8
   Dispensar 50 μl de Control Negativo NO DILUIDO en dos pocillos correspondientes.
   Dispensar 50 μl de cada muestra de leche desnatada NO DILUIDA en los pocillos correspondientes.
   Dilución final del Control Negativo y de las muestras = 1/2
4. Homogeneizar el contenido de los pocillos mediante una breve y suave agitación de la placa (puede usarse para ello un agitador de placas).
5. Cubrir la placa e incubar:
   - Muestras individuales o mezclas de leche de hasta 125 vacas: 60 minutos (±5 min.) a +37ºC (±3ºC) o 14–18 horas a 2–8°C.
   - Mezclas de leche de 126 a 250 vacas: 14–18 horas a 2–8°C.

   Para ambas opciones las placas deben de estar selladas herméticamente o deben cubrirse e incubarse en una cámara húmeda.
6. Eliminar o aspirar el líquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μl de Solución de Lavado tres veces. Eliminar los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Después de la aspiración final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
7. Dispensar 100 μl de Conjugado en cada pocillo.
8. Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos (±5 min.) a +37ºC (±3ºC). La placa(s) debe de estar sellada herméticamente o debe cubrirse e incubarse en cámara húmeda.
9. Repetir el paso 6.
10. Dispensar 100 μl de Substrato TMB n.°12 en cada pocillo.
11. Incubar a 18–26ºC durante 15 minutos (±1 min.).
12. Frenar la reacción dispensando 100 μl por pocillo de Solución de Frenado n.°3. La Solución de Frenado n.°3 debe dispensarse en el mismo orden y al mismo ritmo que la dispensación del Substrato TMB n.°12.
13. Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Resultados

Para la validación de la placa, la densidad óptica del Control Positivo ($CP\bar{x}$) no debería ser superior a 2,000 y la densidad óptica del Control Negativo ($CN\bar{x}$) no debería exceder de 0,500. La diferencia de la densidad óptica entre los Controles Positivo y Negativo ($CP\bar{x} - CN\bar{x}$) debe ser ≥ 0,300.

Las placas deben ser leídas dentro de un periodo máximo de 2 horas tras añadir la Solución de Frenado.

Nota: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y valores %, y la elaboración de resúmenes de datos.

Cálculos

Debe obtenerse el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicadas. La densidad óptica del Control Positivo ($CP\bar{x}$) así como la densidad óptica de las muestras (Muestra A_{450}) deben corregirse restándoles el valor de la densidad óptica del Control Negativo ($CN\bar{x}$):

DO corregida del Control Positivo:	DO corregida de la Muestra:	Coeficiente M/P de la muestra:
$CP\bar{x} - CN\bar{x}$	Muestra $A_{450} - CN\bar{x}$	$M/P\ \% = 100 \times \frac{\text{Muestra } A_{450} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$

Interpretación de los resultados

Interpretación de muestras individuales o mezclas de leche de hasta 125 vacas:

M/P % (incubación corta)	< 30 %	≥ 30 %
M/P % (incubación nocturna)	< 60 %	≥ 60 %
Interpretación	Negativo	Positivo

Interpretación para mezclas de leche de 126 a 250 vacas:

M/P % (incubación nocturna)	< 30 %	≥ 30 %
Interpretación	Negativo	Positivo

Si una mezcla de sueros ofrece un resultado positivo, se recomienda analizar las muestras que componen la mezcla de forma individual.

👁 = *Modificación importante en el manual de instrucciones*

Resumen del protocolo del ensayo

Se recomienda especialmente antes de la realización del test por primera vez, y de la utilización de éste resumen, realizar una lectura completa y cuidadosa del manual de instrucciones.

<table>
<tr><th>Paso</th><th colspan="3">Acción</th></tr>
<tr><td>1. Preparación de los reactivos</td><td colspan="3">Reconstituir los Controles Positivo y Negativo con 5 ml de agua destilada
Diluir la Solución de Lavado Concentrada (10X) 1/10 con agua destilada/desionizada para preparar la Solución de Lavado.</td></tr>
<tr><td>2. Dilución de las muestras</td><td colspan="3">Diluir en un tubo separado el Control Positivo a una relación 1/4 utilizando la Solución de Lavado.
Dispensar 50 µl de Solución de Lavado en cada pocillo de la placa de microtitulación.
Dispensar 50 µl de Control Positivo DILUIDO en dos pocillos correspondientes.
Dilución final del Control Positivo = 1/8
Dispensar 50 µl de Control Negativo NO DILUIDO en dos pocillos correspondientes.
Dispensar 50 µl de cada muestra de leche desnatada NO DILUIDA en los pocillos correspondientes.
Dilución final del Control Negativo y de las muestras = 1/2
Homogeneizar el contenido de los pocillos mediante una breve y suave agitación dela placa (puede usarse para ello un agitador de placas).</td></tr>
<tr><td>3. Incubación de la muestra</td><td colspan="3">Cubrir la placa e incubar:
• Muestras individuales o mezclas de leche de hasta 125 vacas: 60 minutos (±5 min.) a +37ºC (±3ºC) o 14–18 horas a 2–8°C
• Mezclas de leche de 126 a 250 vacas: 14–18 horas a 2–8°C
Para ambas opciones las placas deben de estar selladas herméticamente o deben cubrirse e incubarse en una cámara húmeda.</td></tr>
<tr><td>4. Lavado de la plac</td><td colspan="3">Eliminar o aspirar el líquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado tres veces.</td></tr>
<tr><td>5. Distribución del Conjugado</td><td colspan="3">Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pocillo.</td></tr>
<tr><td>6. Incubación del Conjugado</td><td colspan="3">Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos (±5 min.) a +37ºC (±3ºC). La placa(s) debe de estar sellada herméticamente o debe cubrirse e incubarse en cámara húmeda.</td></tr>
<tr><td>7. Repetir el paso 4</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>8. Distribución del Substrato</td><td colspan="3">Dispensar 100 µl de Substrato TMB n.°12 en cada pocillo.</td></tr>
<tr><td>9. Incubación del Substrato</td><td colspan="3">Incubar a 18–26ºC durante 15 minutos (±1 min.).</td></tr>
<tr><td>10. Frenado de la reacción</td><td colspan="3">Frenar la reacción dispensando 100 µl por pocillo de Solución de Frenado n.°3.</td></tr>
<tr><td>11. Lectura de la placa</td><td colspan="3">Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.</td></tr>
<tr><td rowspan="9">12. Interpretación</td><td colspan="3">Interpretación de muestras individuales o mezclas de leche de hasta 125 vacas:</td></tr>
<tr><td>M/P % (incubación corta)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>M/P % (incubación nocturna)</td><td>< 60 %</td><td>≥ 60 %</td></tr>
<tr><td>Interpretación</td><td>Negativo</td><td>Positivo</td></tr>
<tr><td colspan="3">Interpretación para mezclas de leche de 126 a 250 vacas:</td></tr>
<tr><td>M/P % (incubación nocturna)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>Interpretación</td><td>Negativo</td><td>Positivo</td></tr>
<tr><td colspan="3">Si una mezcla de sueros ofrece un resultado positivo, se recomienda analizar las muestras que componen la mezcla de forma individual.</td></tr>
</table>

N.° de registro: 1213-RD

Para asistencia técnica:

Contacte el representante local IDEXX o visite: idexx.com/contactlpd
Servicio Técnico de IDEXX: 00800 727 43399

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Brucella abortus* in Milch von Rindern

Nur zum tierärztlichen Gebrauch

Name und Verwendungszweck

IDEXX Brucellosis Milk X2 ist ein ELISA Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger der Brucellose (*Brucella abortus*) in Einzelmilch- oder Tankmilchproben von bis zu 250 Rindern.

In den Mitgliedsstaaten der europäischen Union müssen Milch-Untersuchungen mittels ELISA an Tankmilchproben nach Annex C der EU Entscheidung 2008/984/EG durchgeführt werden.

Beschreibung/Prinzipien

Die Vertiefungen der Testplatten sind mit inaktiviertem *B. abortus*-Antigen beschichtet, welches Antikörper, die gegen *B. abortus* gerichtet sind, spezifisch bindet. Gebundene Antikörper werden mit dem Brucellose-Anti-Rind-IgG-PO-Konjugat nachgewiesen, welches seinerseits das TMB-Substrat blau verfärbt.
Nach Zugabe der Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag auf gelb. Die Farbintensität hängt von der Menge der gebundenen Antikörper ab. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch den Vergleich der Extinktionen von Proben und Kontrollen.

Reagenzien		**Menge**
1	Mit *B. abortus*-Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert)	10
2	Positive Kontrolle (lyophilisiert)	1 x 5,0 ml
3	Negative Kontrolle (lyophilisiert)	1 x 5,0 ml
4	Konjugat	1 x 110 ml
A	TMB-Substrat Nr.12	1 x 100 ml
B	Stopplösung Nr.3	1 x 100 ml
C	Waschkonzentrat (10X)	1 x 480 ml
Sonstige Komponenten: Plastikbeutel mit Druckverschluss		1

Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die auf den Etiketten verwendeten internationalen Symbole erläutert.

Lagerung

Reagenzien bei 2–8°C lagern. Bei entsprechender Lagerung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum stabil.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Graduierter Zylinder für die Waschlösung
- Photometer (für 96 Vertiefungen, ausgestattet mit 450 nm Messfiltern)
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie)
- Feuchte Kammer / Inkubator für eine konstante Temperatur von +37°C (±3°C)
- Zentrifuge 2000 x g
- Mikrotiterplatten-Schüttler

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Alle biologischen Substanzen als potenziell infektiös behandeln
- Die Substratlösung reizt Augen, Atemwege und Haut. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden
- Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz oder Gesichtsschutz beim Umgang mit Proben und Reagenzien verwenden.
- Weitere Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten.

Laborpraktiken

- Bei strikter Einhaltung dieser Anweisungen werden optimale Ergebnisse erzielt. Sorgfältiges Pipettieren und Waschen und eine genaue Zeiteinteilung während der Testdurchführung sind notwendig, um die Genauigkeit der Werte zu gewährleisten.
- Substrat nicht starkem Licht oder oxidierenden Mitteln aussetzen. Nur saubere Glas- oder Plastikbehälter benutzen.
- Alle Abfälle vor der Entsorgung ordnungsgemäß dekontaminieren. Den Inhalt im Einklang mit den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Eine Verunreinigung der Bestandteile des Testkits sorgfältig vermeiden. Keine unbenutzten Reagenzien zurück in die Orginalflaschen schütten.
- Die Bestandteile nicht nach Ablauf des Verfalldatums benutzen und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischen.

Vorbereitung der Reagenzien

Kontrollen

Die lyophilisierte positive und die negative Kontrolle werden mit je 5 ml destilliertem Wasser gelöst.

Anmerkungen: Kontrollen aliquotieren und eingefroren lagern.

Waschlösung

Herstellung der Waschlösung aus dem Waschkonzentrat (10X): 1 Teil Waschkonzentrat (10X) mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen. Bei steriler Zubereitung kann die Waschlösung eine Woche bei 2–8°C aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Proben

Nur entrahmte Milchproben verwenden (z.B. durch einen vorgeschalteten Zentrifugationsschritt).

Testanweisung

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf 18–26°C bringen. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen.

1. Positive Kontrolle 1/4 mit der Waschlösung verdünnen.
2. 50 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
3. 50 µl VERDÜNNTE positive Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
   Endverdünnung positive Kontrolle = 1/8
   50 µl UNVERDÜNNTE negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
   50 µl von jeder UNVERDÜNNTEN entrahmten Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
   Endverdünnung negative Kontrolle und Proben = 1/2
4. Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
5. Testplatte abdecken und inkubieren:
   - Einzelmilch- und Tankmilchproben von bis zu 125 Rindern: 60 Minuten (±5 Min.) bei +37°C (±3°C) in oder 14–18 Stunden bei 2–8°C.
   - Tankmilchproben von 126 bis zu 250 Rindern: 14–18 Stunden bei 2–8°C.

   In jedem Fall sollten die Testplatten entweder hermetisch verschlossen inkubiert werden oder abgedeckt in einer feuchten Kammer.
6. Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und jede Vertiefung dreimal mit etwa 300 µl Waschlösung waschen. Den flüssigen Inhalt aus jeder Vertiefung nach jedem Waschen entfernen. Nach dem letzten Waschschritt vorsichtig aber fest die Reste der Waschlösung aus den Vertiefungen auf ein Stück Saugpapier klopfen. Ein Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschschritten und vor Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden.
7. In jede Vertiefung der Testplatte 100 µl Konjugat pipettieren.
8. Testplatte verschließen und 60 Minuten (±5 Min.) bei +37°C (±3°C) inkubieren. Die Testplatte(n) sollten entweder hermetisch verschlossen inkubiert werden oder abgedeckt in einer feuchten Kammer.
9. Schritt 6 wiederholen.
10. In jede Vertiefung 100 µl TMB-Substrat Nr.12 pipettieren.
11. 15 Minuten (±1 Min.) bei 18-26°C inkubieren.
12. Die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung stoppen.
13. Messen der Farbreaktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Ergebnisse

Die gemessene optische Dichte der negativen Kontrolle (NK$\bar{x}$) sollte 0,500, diejenige der positiven Kontrolle (PK$\bar{x}$) 2,000 nicht überschreiten. Die Differenz zwischen der positiven und der negativen Kontrolle (PK$\bar{x}$– NK$\bar{x}$) sollte ≥ 0,300 sein. Die Testplatte innerhalb von 2 Stunden nach Zugabe der Stopplösung mit dem Photometer messen.

Hinweis: IDEXX bietet auch Instrumente und Software zur Berechnung der Mittel- und Prozentwerte an.

Berechnungen

Bei Doppelbestimmungen die Mittelwerte der optischen Dichten (OD) berechnen. Extinktionen der Proben (Probe A450) sowie der positiven Kontrolle (PK$\bar{x}$) werden durch Subtraktion der Extinktion der negativen Kontrolle (NK$\bar{x}$) korrigiert:

Positive Kontrolle	**Proben:**	**Die korrigierten Werte der Proben werden auf den korrigierten Wert der positiven Kontrolle (=100%) bezogen:**
PK$\bar{x}$ – NK$\bar{x}$	Probe A_{450} – NK$\bar{x}$	$\text{P/PK \%} = 100 \text{ x } \frac{\text{Probe } A_{450} - \text{NK}\bar{x}}{\text{PK}\bar{x} - \text{NK}\bar{x}}$

Interpretation der Ergebnisse

Einzelmilch- und Tankmilchproben von bis zu 125 Rindern:

P/PK % (Kurzinkubation)	< 30 %	≥ 30 %
P/PK % (Inkubation über Nacht)	< 60 %	≥ 60 %
Bewertung	negativ	positiv

Tankmilchproben von 126 bis zu 250 Rindern:

P/PK % (Inkubation über Nacht)	< 30 %	≥ 30 %
Bewertung	negativ	positiv

Sollte ein Pool **positiv** sein, wird empfohlen, die Proben des Pools einzeln zu testen.

👁 = *Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation*

Kurzbeschreibung

Es ist empfehlenswert vor dem ersten Gebrauch des Testkits die gesamte Anleitung durchzulesen.

<table>
<tr><th>Schritt</th><th colspan="3">Handlung</th></tr>
<tr><td>1. Vorbereitung des Tests</td><td colspan="3">Die positive und die negative Kontrolle werden mit je 5 ml destilliertem Wasser gelöst.
Herstellung der Waschlösung aus dem Waschkonzentrat (10X): 1 Teil Waschkonzentrat (10X) mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen.</td></tr>
<tr><td>2. Probenverdünnung</td><td colspan="3">Positive Kontrolle 1/4 mit der Waschlösung verdünnen.
50 μl Waschlösung in jede Vertiefung geben.
50 μl VERDÜNNTE positive Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
Endverdünnung positive Kontrolle = 1/8
50 μl UNVERDÜNNTE negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
50 μl von jeder UNVERDÜNNTEN Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
Endverdünnung negative Kontrolle und Proben = 1/2
Den Inhalt der Vertiefungen mit einem Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.</td></tr>
<tr><td>3. Probeninkubation</td><td colspan="3">Testplatte abdecken und inkubieren:
• Einzelmilch- und Tankmilchproben von bis zu 125 Rindern: 60 Minuten (±5 Min.) bei +37°C (±3°C) oder 14–18 Stunden bei 2–8°C.
• Tankmilchproben von 126 bis zu 250 Rindern: 14–18 Stunden bei 2–8°C.
In jedem Fall sollten die Testplatten entweder hermetisch verschlossen inkubiert werden oder abgedeckt in einer feuchten Kammer.</td></tr>
<tr><td>4. Waschen der Platte</td><td colspan="3">Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und jede Vertiefung dreimal mit etwa 300 μl Waschlösung waschen.</td></tr>
<tr><td>5. Konjugatverteilung</td><td colspan="3">In jede Vertiefung der Testplatte 100 μl Konjugat pipettieren.</td></tr>
<tr><td>6. Konjugatinkubation</td><td colspan="3">Testplatte abdecken und 60 Minuten (±5 Min.) bei +37°C (±3°C) inkubieren. Die Testplatten sollten entweder hermetisch verschlossen inkubiert werden oder abgedeckt in einer feuchten Kammer.</td></tr>
<tr><td>7. Schritt 4 wiederholen</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>8. Verteilen des Substrats</td><td colspan="3">In jede Vertiefung 100 μl TMB-Substrat Nr.12 pipettieren.</td></tr>
<tr><td>9. Substratinkubation</td><td colspan="3">15 Minuten (±1 Min.) bei 18–26°C inkubieren.</td></tr>
<tr><td>10. Stoppen der Reaktion</td><td colspan="3">Die Farbreaktion durch Zugabe von 100 μl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung stoppen.</td></tr>
<tr><td>11. Messen der Platte</td><td colspan="3">Messen der Farbreaktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.</td></tr>
<tr><td rowspan="8">12. Interpretation</td><td colspan="3">Einzelmilch- und Tankmilchproben von bis zu 125 Rindern:</td></tr>
<tr><td>P/PK % (Kurzinkubation)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>P/PK % (Inkubation über Nacht)</td><td>< 60 %</td><td>≥ 60 %</td></tr>
<tr><td>Bewertung</td><td>Negativ</td><td>Positiv</td></tr>
<tr><td colspan="3">Tankmilchproben von 126 bis zu 250 Rindern:</td></tr>
<tr><td>P/PK % (Inkubation über Nacht)</td><td>< 30 %</td><td>≥ 30 %</td></tr>
<tr><td>Bewertung</td><td>Negativ</td><td>Positiv</td></tr>
<tr><td colspan="3">Sollte ein Pool positiv sein, wird empfohlen, die Proben des Pools einzeln zu testen</td></tr>
</table>

Zul.–Nr.: BGAF-B 023

Technischer Kundendienst:

Kontaktieren Sie Ihren zuständigen IDEXX Area Manager oder Vertriebshändler oder besuchen Sie unsere Webseite: idexx.com/contactlpd

Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Symbol-Beschreibungen Descrizione dei simboli / Descripciones de los símbolos / Descrições do símbolos

LOT	**Batch Code (Lot)** Numéro de lot Chargenbezeichnung (Ch.-B.) Codice del lotto (partita) Código de lote (Lote) Número de Partida (Lote)		**Use by date** À utiliser avant la date Verwendbar bis Usare entro Usar antes de Data de Vencimento
SN	**Serial Number** Numéro de série Seriennummer Numero di serie Número de serie Número de série	CONTROL +	**Control positive** Contrôle positif Positive Kontrolle Controllo Positivo Control Positivo Controle Positivo
REF	**Catalog Number** Numéro de catalogue Katalognummer Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo	CONTROL –	**Control negative** Contrôle négatif Negative Kontrolle Controllo Negativo Control Negativo Controle Negativo
	**Date of manufacture** Date de fabrication Herstellungsdatum Data di produzione Fecha de fabricación Data de Fabricação	IVD	**In vitro diagnostic** Diagnostic in vitro In vitro-Diagnostikum Diagnostico in vitro Diagnóstico in-vitro Diagnóstico in-vitro
	**Manufacturer** Fabricant Hersteller Ditta produttrice Fabricante Fabricante		**Temperature limitation** Limite de température Zulässiger Temperaturbereich Limite di temperatura Límite de temperatura Limite de temperatura
EC REP	**Authorized Representative in the European Community** Représentant agréé pour la Communauté européenne Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea Representante autorizado na Comunidade Européia Representante autorizado en la Comunidad Europea		**Consult instructions for use** Consulter la notice d'utilisation Gebrauchsinformation beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar las instrucciones de uso Consulte instruções para o uso

Manufacturer

IDEXX Switzerland AG
Stationsstrasse 12
3097 Liebefeld-Bern
Switzerland

EU-Representative

IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com